Journal of Horticultural Science
https:// jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 1, Spring 2022, p. 29-41

Investigation of Morpho-Physiological Properties of Peppermint (*Mentha piperita* L.) Affected by Carbon Sources of Ethanol and Methanol

V. Akbarpour[1]*, M. Motaharinezhad[2], M.A. Bahmanyar[3]

Received: 15-04-2020
Revised: 13-10-2020
Accepted: 08-01-2022
Available Online: 20-06-2022

How to cite this article:
Akbarpour V., Motaharinezhad M., and Bahmanyar M.A. 2022. Investigation of Morpho-Physiological Properties of Peppermint (*Mentha piperita* L.) Affected by Carbon Sources of Ethanol and Methanol. Journal of Horticultural Science 36(1): 29-41. (In Persian with English abstract)
DOI: 10.22067/JHS.2022.61778.0

Introduction

Nowadays, spraying method is used in plant nutrition to optimize the use of chemical fertilizers and reduce environmental hazards. With the foliar solution, the elements are quickly transferred to the plant and delivered to the branch, leaf, or fruit. Surveys show that increase performance per unit area is one of the most important things that has attracted the attention of many researchers. The first requirement for high performance is high dry matter production per unit area. Some experiments have shown that increasing the amount of carbon dioxide in the air can increase yield, accelerate flowering and accumulate carbohydrates in plants. One of the solutions to increase carbon dioxide concentrations in plants is to use compounds such as ethanol and methanol. Therefore feeding plants with alcohols such as ethanol and methanol as carbon sources is one of the appropriate methods to increase their quantitative and qualitative properties.

Materials and Methods

Due to the importance of peppermint (*Mentha piperita* L.) in the production of valuable secondary metabolites, and also the effect of ethanol and methanol on some morphological and physiological parameters of this plant, a pot experiment was conducted in factorial based on completely randomized design with three replications in the research greenhouse of Shahed University in 2018. Foliar treatments included different concentrations of 0, 15, 30 and 45% ethanol, methanol and combine them that was done in three stages. The studied traits were plant height, number of leaves per plant, biological yield, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoid, flavonoid, essential oil percentage, essential oil yield and protein percentage. Data analysis was performed using SAS statistical software (version 9.2) and mean treatments were compared by LSD test. Also charts were drawn by excel software.

Results and Discussion

The results showed that the simple effects of ethanol and methanol on plant height, biological yield, flavonoid content, essential oil percentage, essential oil yield and protein percentage were significant but their interactions were not significant. Ethanol 45% had the most effect on percentage and yield of essential oil and protein percentage. But the use of 15% ethanol treatment had the highest value in other traits (plant height, total phenol and flavonoids), which was at a statistical level with 45% methanol treatment. Also interaction between ethanol and methanol on leaf number per plant, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoid was significant at 1% probability level. The highest number of leaves per plant and chlorophyll a (29.55 µg/g fresh leaf weight) was observed in the combination of 15% ethanol and 15% methanol, while the highest amount of chlorophyll b (20.86 µg/g fresh leaf weight) and total chlorophyll (49.85 µg/g fresh leaf weight) was related to

1- Assistant Professor of Horticultural Sciences and Engineering Department, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
(*- Corresponding Author Email: v.akbarpour@sanru.ac.ir)
2- M.Sc. Student of Medicinal Plants, Sana Institute of Higher Education, Sari. Iran
3- Professor, Department of Soil Sciences, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

the combined application of 15% ethanol and 45% methanol.

Conclusion

Foliar spraying is one of the methods of fertilization and supply of nutrients to plants that due to high absorption rate nutrients can be made available to plants in the shortest time. The results of this study showed that all the studied traits were significantly affected by one or more of the ethanol and methanol treatments. Therefore, the foliar application of ethanol and methanol as carbon sources has an important role in improving the qualitative and quantitative parameters of peppermint.

Keywords: Ethanol, Methanol, Peppermint, Secondary metabolite, Spray

نشریه علوم باغبانی
https:// jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱، ص ۴۱-۲۹

بررسی خصوصیات مورفو- فیزیولوژیکی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) تحت تأثیر منابع کربنی اتانول و متانول

وحید اکبرپور[۱*]- مصطفی مطهری‌نژاد[۲]- محمدعلی بهمنیار[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۸

چکیده

تغذیه گیاهان با الکل‌هایی نظیر اتانول و متانول به عنوان منابع کربنی یکی از روش‌های مناسب جهت افـزایش خصوصـیات کمّـی و کیفـی آن‌هـا می‌باشد. با توجه به اهمیت گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) در تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش و همچنین تأثیر اتانول و متانول بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی این گیاه، آزمایشی گلدانی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۹۷ انجام شد. تیمارهای محلول‌پاشی شامل غلظت‌های مختلف صفر، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ درصد از اتانول و متانول بود. نتایج نشـان داد که اتانول ۴۵ درصد بیشترین تأثیر را بر درصد اسانس، عملکرد اسانس و درصد پروتئین داشت. ولی استفاده از تیمار ۱۵ درصد اتانول بالاترین مقـدار را در سایر صفات (ارتفاع بوته، فنل و فلاونوئید کل) به خود اختصاص داد که با تیمار ۴۵ درصد متـانول در یـک سـطح آمـاری قـرار داشـت. همچنـین بیشترین تعداد برگ و کلروفیل a در تیمار تلفیقی ۱۵ درصد اتانول و ۱۵ درصد متانول مشاهده شد، در صورتی‌که بالاترین میزان کلروفیل b و کلروفیـل کل مربوط به کاربرد تلفیقی ۱۵ درصد اتانول و ۴۵ درصد متانول بود. بنابراین، با توجه به اثر مثبت محلول‌پاشی اتانول و متانول در خصوصـیات رشـدی گیاه نعناع فلفلی، استفاده از این ترکیبات الکلی توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: اتانول، متانول، متابولیت ثانویه، محلول‌پاشی، نعناع فلفلی

مقدمه

نعناع فلفلـی (*Mentha piperita* L.) از جملـه گیاهـان دارویـی ارزشمند خانواده Lamiaceae است که بومی مناطق معتدلـه دنیـا بـه ویژه اروپا، آمریکای شمالی و شمال افریقـا مـی‌باشـد، امـا امـروزه در سراسر دنیا کشـت مـی‌گـردد (Mehrafarin *et al.*, 2011). بـرگ و سرشاخه‌های گل‌دار و اسانس این گیـاه در صـنایع دارویـی و غـذایی کاربرد دارد و افزایش کمّی و کیفی اسانس آن در طـی تکنیـک‌هـای زراعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Shah and Mello, 2004). منتول و منتون اصلی‌ترین اجزاء اسانس بوده و خواص ضد میکروبـی دارند (Dai *et al.*, 2010; Tarhan *et al.*, 2010). طبـق اسـتاندارد سازمان گیاه درمانی اروپا[۴]، مقدار منتول، معیار اصلی در تعیین کیفیـت نعناع فلفلی است که می‌توان با به‌کارگیری شرایط رشدی مناسـب در راستای افزایش عملکرد کمّی و کیفی آن گـام برداشـت (Kumar *et al.*, 2004).

یکی از این فاکتورهای زراعی مـؤثر در رشـد و افـزایش عملکـرد کمّی و کیفی گیاهان، محلول‌پاشی با استفاده از منابع کربنی است. در سال‌های اخیر اطمینان از تولید پایدار فرآورده‌های غذایی سالم همـراه با حفظ محیط‌زیست و توجه به مناسبات اجتماعی و اقتصادی موضوع قابل توجهی در علوم مختلـف ماننـد کشـاورزی، اکولـوژی و محـیط زیسـت بـوده و مـورد توجـه روزافـزون کشـاورزان، پژوهشـگران و

۱- استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشـکده علـوم زراعـی، دانشـگاه علـوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
(*- نویسنده مسئول: Email: v.akbarpour@sanru.ac.ir)
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، مؤسسه آموزش عالی سنا، ساری
۳- استاد گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشـاورزی و منابع طبیعی ساری

DOI: 10.22067/JHS.2022.61778.0

4- European Scientific Cooperative on Phytotherapy

سیاست‌گذاران قرار گرفته است (Nourafkan and Kalantari, 2017). اولین شرط جهت دستیابی به عملکرد بالا در واحد سطح، تولید ماده خشک زیاد است، زیرا حدود ۹۰ درصد وزن خشک گیاهان ناشی از آسیمیلاسیون دی‌اکسیدکربن توسط فتوسنتز می‌باشد و نقش رنگیزه‌های گیاهی اعم از کلروفیل‌ها و کارتنوئید در این امر بسیار مهم است. در نتیجه افزایش سرعت تثبیت دی‌اکسیدکربن برای بالا بردن ظرفیت تولید گیاهان زراعی می‌تواند مفید واقع گردد (Pilehvari *et al.*, 2008; Ramirez *et al.*, 2006). آزمایش‌های متعددی نشان داد که افزایش میزان دی اکسیدکربن در هوا منجر به افزایش عملکرد، تسریع گلدهی و تجمع کربوهیدرات در گیاهان می‌شود (Abbasian *et al.*, 2016). یکی از راه‌کارهای افزایش غلظت دی‌اکسیدکربن در گیاهان، استفاده از ترکیباتی مانند اتانول و متانول است. اتانول و متانول از جمله ساده‌ترین الکل‌ها محسوب می‌شوند. متانول به صورت فرمالدهید و دی‌اکسیدکربن در گیاه اکسید شده و به صورت اسیدهای آمینه سرین و میتونین و کربوهیدرات‌ها در بافت‌های مختلف گیاهان سه کربنه سنتز می‌شود (Nazari Moghadam, 2014). همچنین، پژوهش‌ها نشان داده است اتانول پس از نفوذ به درون بافت گیاه تبدیل به فرمالدهید شده و این ترکیب در نهایت به دی‌اکسیدکربن، اکسید می‌گردد. دی‌اکسیدکربن تولید شده باعث افزایش غلظت دی‌اکسیدکربن داخلی برگ شده که این فرآیند منجر به افزایش راندمان فتوسنتزی می‌شود (Mehrafarin *et al.*, 2015).

نام قدیم متانول، الکل چوب بود که نشان دهنده منشأ گیاهی این ماده است (Dorokhov *et al.*, 2015). تا سال‌های اخیر، متانول ساطع شده از گیاهان به عنوان یک محصول جانبی بیوشیمیایی تلقی می‌شد، اما مطالعات در دهه گذشته نقش آن را به عنوان یک مولکول سیگنال در ارتباط گیاه و محیط پیرامون نشان داده است. علاوه بر این، متانول در فرآیندهای شیمیایی متابولیک در طول رشد و نمو گیاه شرکت می‌کند. همچنین در زمان ایجاد تنش در گیاهان، ژن‌های القایی متانول[1] در گیاه فعال شده و سبب مقاومت گیاه در برابر عوامل زنده و غیرزنده می‌شود (Dorokhov *et al.*, 2018). نقش متانول در کنترل رونویسی ژن‌های مقاومت در گیاه *Arabidopsis thaliana* در پاسخ به تنش‌های زیستی نیز به اثبات رسیده است (Deleris *et al.*, 2016). برخلاف مشارکت متانول در فرآیندهای اپی‌ژنتیکی، در سال‌های اخیر مطالعات انجام شده بر روی مشارکت پکتین‌ها و پکتین متیل استرازها در تشکیل متانول، به نقش مهم متانول در رشد گیاهان و همچنین پاسخ آنها به اثرات تنش اختصاص یافته است (Dorokhov *et al.*, 2015; Komarova *et al.*, 2014). مشارکت متانول در رشد و نمو، توسط عملکرد پکتین‌ها در تشکیل دیواره سلولی تعیین می‌شود (Kim and Brandizzi, 2016; Atmodjo *et al.*, 2013). نقش پکتین‌ها در رشد و نمو آرابیدوپسیس به اثبات رسیده است به‌طوری‌که در گیاهان جهش‌یافته که رشد مطلوبی ندارند، سنتز پلی‌ساکاریدهای پکتین مختل می‌شود (Saffer, 2018). سلول‌های گیاهی می‌توانند الکل‌هایی نظیر متانول را جذب کرده و آنها را تبدیل به برخی از ترکیبات گروه متیل مانند متیلن تتراهیدروفولات، متیل تتراهیدروفولات و S-آدنوزیل متیونین کنند. این ترکیبات نیز سبب تولید سرین و متیونین می‌شوند. سرین سبب تولید ساکارز شده و متیونین نیز پیش‌ماده تولید اتیلن می‌باشد (Gout *et al.*, 2000).

الکل‌ها می‌توانند به عنوان یکی از نهاده‌های مورد نظر در نظام‌های کشاورزی ارگانیک و یا نیمه‌ارگانیک به کار گرفته شوند. محلول‌پاشی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) به واسطه استفاده از تیمارهای هیدروالکلی اتانول و متانول اثری توجیه‌پذیر در استفاده از این فن‌آوری در افزایش عملکرد زراعی این گیاه داشته است و نیز به دلیل متابولیزه شدن کامل متانول به اجزای خود و تبدیل شدن به اسیدهای آمینه در گیاهان اثر گذار است (Khosravi *et al.*, 2012). در پژوهشی دیگر مشخص شد که محلول‌پاشی شنبلیله (*Trigonella foenum*-graecum L.) با متانول ۴۰ درصد سبب افزایش تعداد ساقه فرعی، تعداد برگ، وزن خشک بوته، عملکرد دانه، عملکرد موسیلاژ و ارتفاع بوته می‌شود (Mehrafarin *et al.*, 2015). همچنین محلول‌پاشی تیمارهای هیدروالکلی سبب افزایش میزان اسانس، تیمول و کارواکرول آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) شد (Sajedi *et al.*, 2012).

پژوهش‌ها نشان داده که محلول‌پاشی با الکل‌ها بویژه اتانول و متانول، یکی از راه‌های مؤثر و مناسب در افزایش تولید محصولات کشاورزی به‌خصوص گیاهان دارویی می‌باشد. در همین راستا و به دلیل اهمیت گیاه دارویی نعناع فلفلی پژوهشی به‌منظور بررسی اثرات محلول‌پاشی اتانول و متانول بر ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی نعناع فلفلی صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تأثیر منابع مختلف کربنی (اتانول و متانول) بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.)، آزمایشی گلدانی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۹۷ انجام شد. در این پژوهش تیمارهای محلول‌پاشی شامل غلظت‌های مختلف صفر، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ درصد از اتانول و متانول بود که در سه مرحله برای هر یک از این ترکیبات صورت گرفت. محلول‌پاشی تیمار شاهد نیز با آب مقطر انجام شد.

1- Methanol Inducible Genes

مرحله اول محلول‌پاشی یک ماه پس از کشت، و دو مرحله بعدی در طی فصل رشد گیاه با فواصل ۱۴ روز انجام شد (Nourafkan and Kalantari, 2017).

مرحله برداشت نیز در اوج دوره رویشی (سه ماه پس از کشت) صورت گرفت. برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی از روش آرنون (Arnon, 1967) استفاده شد. براساس این روش مقدار ۰/۲ گرم نمونه تازه با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد همون گردیده و در نهایت میزان جذب عصاره سانتریفیوژ شده توسط اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر قرائت شد و با استفاده از فرمول‌های زیر میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید محاسبه گردید.

$$Chl\ a = (12.25\times A663.2 - 2.79\times A646.8)$$

$$Chl\ b= (21.50\times A646.8 - 5.1\times A663.2)$$

$$Total\ chl = (7.15\times A663.2 + 18.71\times A646.8)$$

$$Carotenoid= (1000\times A470 - 1.82\times Chl\ a - 85.02\times Chl\ b)/198$$

به منظور سنجش پروتئین، به ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس ۰/۵ مولار با pH معادل ۶/۸، ۲ گرم SDS افزوده و حل شد. ۲۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج به نمونه‌های تازه برگ در دمای ۴ درجه سانتیگراد افزوده شد. سپس محلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. به ۵ میلی‌لیتر محلول برادفورد، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره فوق اضافه و پس از ۳۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه، جذب عصاره فوق در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پروتئین برحسب میلی‌گرم بر گرم بافت تر برگ محاسبه گردید. با حل نمودن ۱ میلی‌گرم پودر سرم آلبومین گاوی (BSA) با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر، محلول استاندارد پروتئین تهیه شد (Bradford, 1976). اسانس‌گیری با استفاده از روش کلونجر صورت گرفت و درصد اسانس موجود در هر نمونه تعیین گردید. جهت اندازه‌گیری فلاونوئید کل نیز از روش ابراهیم‌زاده و همکاران استفاده شد (Ebrahimzadeh *et al.*, 2010).

تجزیه و تحلیل داده‌ها، با برنامه آماری SAS (نسخه ۹/۲) انجام شد و میانگین تیمارها توسط آزمون LSD مورد مقایسه قرار گرفت. رسم نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Excel انجام گردید.

نتایج و بحث

ارتفاع گیاه: نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده اتانول و متانول بر ارتفاع گیاه به ترتیب در سطح احتمال یک و پنج درصد معنی‌دار بود ولی اثر متقابل آنها بر این صفت غیرمعنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر محلول‌پاشی ترکیبات اتانول و متانول بر ویژگی‌های مورفو-فیزیولوژیکی گیاه نعناع فلفلی

Table 1- ANOVA (Mean Squares) for foliar application of ethanol and methanol on morpho-physiological characteristics of peppermint

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares										
		ارتفاع گیاه Plant height	تعداد برگ در بوته Number of leaves per plant	عملکرد بیولوژیک Biological yield	کلروفیل a Chl a	کلروفیل b Chl a	کلروفیل کل Total chl	کاروتنوئید Carotenoid	فلاونوئید Flavonoid	درصد اسانس Essential oil percentage	عملکرد اسانس Essential oil yield	درصد پروتئین Protein percentage
اتانول Ethanol (E)	3	69.9**	2240.5**	8.1*	243.6*	42.4*	454.9**	43.4**	126.9**	0.49**	283.6*	39.4**
متانول Methanol (M)	3	46.7*	1205.4**	6.1*	26.6*	55.9*	147.9*	13.6**	78.5**	0.09ns	89.3ns	8.2*
E × M	9	14.9ns	252.2**	3.1ns	48.7**	40.8*	122.3*	16.4**	7.1ns	0.01ns	21.6ns	2.7ns
خطای آزمایش Error	30	14.6	53.4	2.1	11.2	18.7	43.6	2.7	5.9	0.07	67.6	2.9
ضریب تغییرات C.V (%)	–	9.9	27.2	10.3	14.9	25.2	19.1	21.4	16.1	18.9	19.5	19.3

*، ** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم معنی‌داری

*, ** and ns : significant at the 5% and 1% of probability levels and non-significant, respectively

جدول مقایسه میانگین اثر ساده اتانول بر ارتفاع گیاه نشان داد که بیشترین ارتفاع گیاه مربوط به تیمار ۱۵ درصد حجمی اتانول (۴۰/۴۵ سانتی‌متر) بود که از لحاظ آماری با دیگر تیمارها به جز تیمارهای آب مقطر و ۴۵ درصد اتانول اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین کمترین آن مربوط به تیمار ۴۵ درصد حجمی اتانول (۳۵/۰۴ سانتی‌متر) بود که با تیمار آب مقطر (شاهد) در یک سطح آماری قرار داشت (جدول ۲). بر اساس جدول مقایسه میانگین با افزایش غلظت اتانول و متانول از ارتفاع گیاه کاسته شد.

مشارکت متانول در رشد و نمو، توسط عملکرد پکتین‌ها در تشکیل دیواره سلولی تعیین می‌شود (Kim and Brandizzi 2016;

Atmodjo, 2013). نقش پکتین‌ها در رشد و نمو آرابیدوپسیس به اثبات رسیده است به‌طوری‌که در گیاهان جهش‌یافته که رشد مطلوبی ندارند، سنتز پلی‌ساکاریدهای پکتین مختل می‌شود (Saffer, 2018). محلول‌پاشی متانول به‌طور غیرمستقیم نیز باعث تحریک باکتری‌های متیل تروفیک می‌شود که روی اکثر برگ‌های گیاهان زندگی می‌کنند. این باکتری‌ها مقداری از متانول موجود در برگ‌ها را مصرف می‌کنند و از طریق تولید اکسین و سیتوکینین، باعث رشد گیاه می‌شوند (Abbasian *et al*., 2016; Ivanova *et al*., 2001).

جعفری مرندی و مجد (Jafari Marandi and Majd, 2008) اظهار داشتند به‌کار بردن تیمارهای سبک الکلی (اتانول ۳ درصد) باعث تسریع رشد گیاهان و افزایش طول و ضخامت ساقه در گل‌های شاخه بریده میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) می‌شود. صفرزاده ویشکائی (Safarzadeh Vishkaee, 2007) گزارش کردند که ارتفاع بوته در بادام زمینی (*Arachis hypogae*) پس از محلول‌پاشی متانول به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که کاربرد متانول ۳۰ درصد در پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) موجب افزایش ارتفاع بوته شد. مخدوم و همکاران (Makhdum *et al*., 2002) علت این امر را در آسیمیلاسیون بیشتر کربن و رقابت بیشتر گیاهان برای دریافت نور دانستند. افزایش سرعت رشد و ارتفاع محصول پس از محلول‌پاشی متانول به علت افزایش غلظت دی‌اکسیدکربن در برگ‌ها و استفاده از متانول به عنوان یک منبع مستقیم در سنتز اسیدآمینه سرین و کاهش هدررفت کربن از طریق تنفس نوری می‌باشد. به نظر می‌رسد که محلول‌پاشی متانول، با افزایش تولید سیتوکینین موجب افزایش تقسیم سلولی، تحریک رشد و افزایش ارتفاع در گیاهان می‌شود (Nadali *et al*., 2010).

جدول ۲- اثر محلول‌پاشی ترکیبات اتانول و متانول بر ویژگی‌های مورفو-فیزیولوژیکی گیاه نعناع فلفلی

Table 2- The effect of foliar application of ethanol and methanol on morpho-physiological traits of peppermint

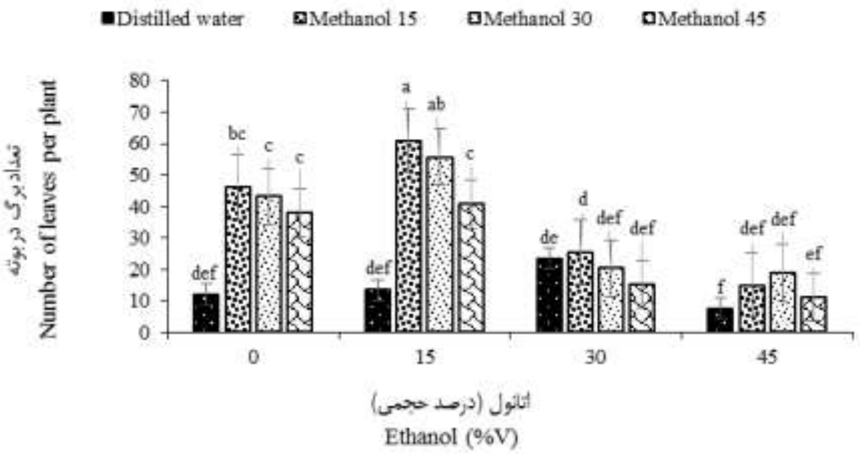
تیمارهای آزمایشی Experimental treatments	ارتفاع گیاه Plant height (cm)	عملکرد بیولوژیک Biological yield (g.plant⁻¹)	فلاونوئید Flavonoid (mg quercetin.g⁻¹ FW)	درصد اسانس Essential oil percentage	عملکرد اسانس Essential oil yield (mg.plant⁻¹)	درصد پروتئین Protein percentage
شاهد (آب مقطر) Control (Distilled water)	36.32^b	13.09^b	12.44^c	1.35^b	39.06^b	7.43^b
اتانول Ethanol (%V)						
15	40.45^a	15.18^a	18.42^a	1.32^b	39.69^b	7.26^a
30	39.01^a	14.16^ab	11.61^b	1.42^b	40.79^b	10.22^a
45	35.04^b	13.95^b	17.15^a	1.76^a	49.47^a	10.70^a
متانول Methanol (%V)						
15	40.91^a	14.74^a	13.91^bc	1.33^b	39.87^b	9.21^ab
30	39.25^ab	14.42^a	15.42^b	1.51^ab	45.27^ab	9.92^a
45	37.73^ab	14.21^ab	18.42^a	1.53^ab	43.85^ab	8.37^b

در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

In each column, the means with similar letters are not significantly different

تعداد برگ در بوته: نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر ساده و متقابل اتانول و متانول بر تعداد برگ در بوته در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بیشترین تعداد برگ در بوته مربوط به تیمار تلفیقی اتانول ۱۵ و متانول ۱۵ درصد حجمی (۶۱ عدد در بوته) و کمترین آن مربوط به تیمار تلفیقی اتانول ۴۵ درصد حجمی و آب مقطر (۷/۶ عدد در بوته) بود (شکل ۱). در شرایط تلفیقی بدون اتانول (آب مقطر) هرچه قدر غلظت متانول افزایش یافت، از تعداد برگ در بوته کاسته شد. در تیمارهای تلفیقی اتانول ۱۵ درصد حجمی و نیز ۳۰ درصد حجمی، متانول با غلظت ۱۵ درصد حجمی اثر تحریک‌کننده بر این صفت داشت اما با افزایش غلظت متانول از تعداد برگ در بوته کاسته شد. اما در شرایط تلفیقی اتانول با غلظت ۴۵ درصد حجمی، اعمال متانول تا غلظت ۳۰ درصد حجمی سبب تأثیر افزاینده بر تعداد برگ در بوته گردید و با افزایش غلظت به ۴۵ درصد حجمی از تعداد برگ کاسته شد.

آزمایشی به منظور بررسی اثر محلول‌پاشی متانول (در چهار غلظت) بر کیفیت و عملکرد گیاه ترخون (*Artemisia dracunculus* L.) انجام پذیرفت و بر اساس آن مشخص شد که محلول‌پاشی این ترکیب بر تعداد برگ اثر معنی‌داری داشت و بیشترین میانگین این صفت در کاربرد متانول ۴۰ درصد مشاهده شد (Moradi and Ebadati Esfahani, 2016).



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل محلول‌پاشی اتانول و متانول بر تعداد برگ گیاه در بوته در گیاه نعناع فلفلی

(میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با هم اختلاف معنی‌داری ندارند)

Figure 1- Comparison of the mean of interaction of ethanol and methanol foliar application on number of leaves per plant in peppermint (LSD, p≤0.05)

(In each column, the means with similar letters are not significantly different)

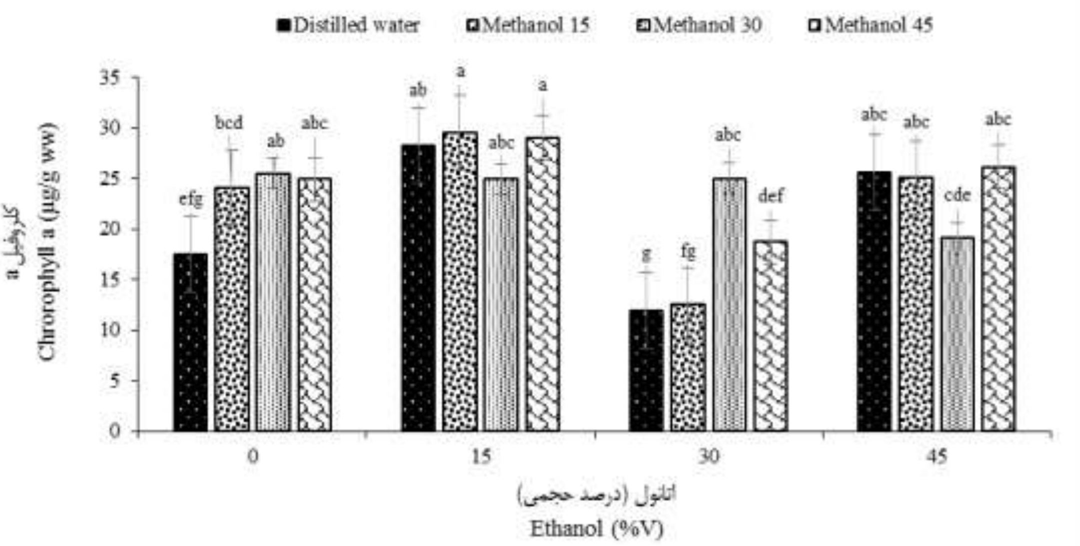
برخی مطالعات نشان داد که با مصرف متانول سرعت رشد گیاه و نیز تعداد برگ در گیاه بادام زمینی به مقدار بیشتری افزایش یافت زیرا متابولیسم متانول منجر به افزایش قندسازی در برگ‌ها می‌شود و این امر سبب افزایش مقدار آماس سلولی بافت و افزایش سرعت آسیمیلاسیون و رشد در گیاهان تیمار شده با آن می‌گردد (Ramirez *et al.*, 2006). بر اساس یافته‌های حاصل از پژوهش نورافکن و کلانتری (Nourafkan and Kalantari, 2017) اثر مثبت و معنی‌دار محلول‌پاشی الکل به خصوص در غلظت‌های ۳۰ درصد اتانول و متانول در تعداد برگ در گیاه دیده شد. همچنین استفاده از اتانول و متانول سبب افزایش تعداد برگ در گیاه دارویی آویشن شد (Sajedi Moghadam *et al.*, 2012). بنابراین استفاده از منابع کربنی و محرک رشد می‌تواند سبب افزایش زیست‌توده و عملکرد گیاهان گردد.

عملکرد بیولوژیک: بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) مشخص شد که اثر ساده تیمارهای الکلی اتانول و متانول بر عملکرد بیولوژیک گیاه نعناع فلفلی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود ولی اثر متقابل این تیمارها بر صفت عملکرد بیولوژیک غیرمعنی‌دار شد. بالاترین عملکرد بیولوژیک مربوط به تیمار اتانول با غلظت ۱۵ درصد حجمی (۱۵/۱۸ گرم در بوته) بود که از لحاظ آماری با سایر غلظت‌های متانول و نیز اتانول ۳۰ درصد اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

برخی از مطالعات نشان داده که هم تولید زیست‌توده و هم فعالیت فتوسنتزی در جلبک‌ها در غلظت‌های پایین متانول افزایش یافته است (Theodoridou *et al.*, 2002). خسروی و همکاران (Khosravi *et al.*, 2012) گزارش کردند که محلول‌پاشی الکل‌هایی نظیر متانول به عنوان یک منبع کربنی و محرک زیستی می‌تواند باعث افزایش بیوماس و عملکرد گیاه دارویی سرخارگل شود. نادعلی و همکاران (Nadali et al., 2010) اظهار داشتند که استفاده از محلول‌پاشی متانول در چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) میزان وزن و عملکرد محصول را افزایش می‌دهد. پژوهش‌ها حاکی از این است که گیاهان تیمار شده با متانول می‌توانند فتوسنتز خالص خود را افزایش دهند و عملکرد خود را بهبود بخشند. متانول سبب افزایش راندمان تبدیل کربن می‌شود، در واقع متانول از مولکول دی‌اکسیدکربن کوچکتر است لذا می‌تواند به راحتی توسط گیاهان سه کربنه به عنوان منبع کربن جهت افزایش عملکرد ماده خشک گیاهان، مورد استفاده قرار گیرد. همچنین متانول با ایجاد تأخیر در پیری برگ‌ها، فعالیت فتوسنتزی برگ‌ها را تشدید کرده و از این راه عملکرد بیولوژیک را افزایش می‌دهد (Nonomura and Benson, 1992). کاربرد متانول می‌تواند سبب افزایش وزن تر و خشک گیاهان شود. یکی از مهم‌ترین دلایل تجمع ماده خشک در اثر کاربرد متانول، مختل شدن تنفس نوری و در نتیجه افزایش ماده خشک می‌باشد (Nazari Moghadam, 2014). در پژوهشی که بر روی گیاه آویشن باغی صورت گرفت مشخص شد که بیشترین عملکرد ماده خشک در واحد سطح در تیمار ۳۰ درصد متانول و ۲۰ درصد اتانول به‌دست آمد (Sajedi Moghadam *et al.*, 2012). در پژوهش‌های مختلفی نشان داده شده است که عملکرد و رشد در گیاهان سه کربنه تحت تأثیر محلول‌پاشی با متانول افزایش یافت و این امر شاید به این دلیل باشد که متانول به عنوان منبع کربن در این گیاهان محسوب می‌گردد

(Abbasian *et al.*, 2016).

کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل: نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان که اثر متقابل اتانول و متانول بر کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین اثر متقابل اتانول و متانول بر کلروفیل a نشان داد که بیشترین کلروفیل a مربوط به تیمار تلفیقی اتانول ۱۵ و متانول ۱۵ درصد حجمی (۲۹/۵۵ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) و ۱۵ درصد اتانول با ۴۵ درصد متانول (۲۸/۹۹ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) بود. همچنین کمترین میانگین این صفت در تیمار تلفیقی اتانول ۳۰ درصد و آب مقطر (۱۱/۹۳ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل محلول‌پاشی اتانول و متانول بر میزان کلروفیل a در گیاه نعناع فلفلی

(میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با هم اختلاف معنی‌داری ندارند)

Figure 2- Comparison of the mean of interaction of ethanol and methanol foliar application on chlorophyll a in peppermint (LSD, p≤0.05)

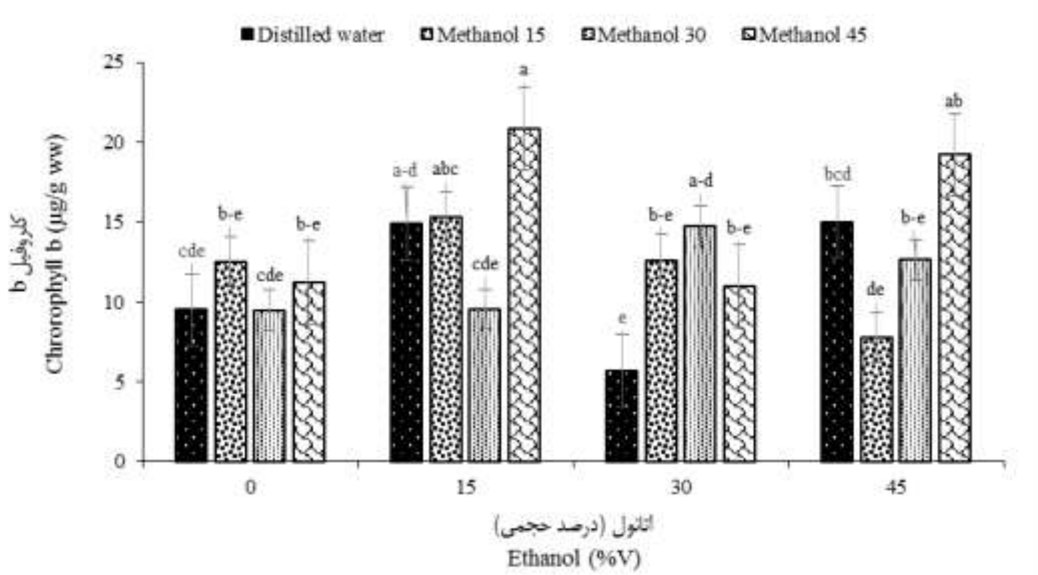
(In each column, the means with similar letters are not significantly different)

مقایسه میانگین اثر متقابل اتانول و متانول بر کلروفیل b نشان داد که بیشترین کلروفیل b مربوط به اتانول ۱۵ و متانول با غلظت ۴۵ درصد حجمی (۲۰/۸۶ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) و کمترین آن مربوط به اتانول ۳۰ درصد حجمی و آب مقطر (۵/۷ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) بود (شکل ۳).

همچنین مقایسه میانگین اثر متقابل اتانول و متانول بر کلروفیل کل ثابت کرد که بیشترین کلروفیل کل مربوط به اتانول ۱۵ و متانول ۴۵ درصد (۴۹/۸۵ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) و کمترین آن مربوط به اتانول ۳۰ درصد و آب مقطر (۱۷/۶۴ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) بود (شکل ۴).

از دلایل افزایش مقدار کلروفیل در اثر محلول‌پاشی متانول، وجود متابولیسم تک‌کربنه در گیاهان است. ساخت کلروفیل در برگ گیاه به وجود اسیدآمینه S–آدنوزیل متیونین وابسته است. این اسیدآمینه به کمک آنزیم آدومتیونین سنتتاز در چرخه متابولیسم تک‌کربنه ساخته می‌شود و اسیدآمینه متیونین پیش‌ماده ساخت آن است. در این چرخه متانول با تبدیل به اسید فورمیک با تتراهیدروفولیت ترکیب شده و طی فرآیندی زمینه ساخت متیونین را فراهم می‌کند (Chen et al., 1997; Hanson and Roje, 2001). برخی از مطالعات نشان داده که هم تولید زیست‌توده و هم فعالیت فتوسنتزی در جلبک‌ها در غلظت‌های پایین متانول افزایش یافته است (Theodoridou *et al.*, 2002). همچنین استفاده از محلول‌پاشی متانول سبب افزایش کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در برگ‌های گیاه انگور (*Vitis vinifera*) گردید (Ramadan and Omran, 2005). باقری و همکاران (Bagheri *et al.*, 1997) گزارش کردند که محلول‌پاشی ترکیبات کربنی متانولی در چهار غلظت صفر، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ درصد در پنج نوبت بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی اعم از کلروفیل a، کلروفیل b، و کلروفیل کل اثر معنی‌داری داشت که بالاترین میانگین این صفات در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد مشاهده شد. در پژوهشی دیگر گزارش شده است که مقدار بیوسنتز کلروفیل در گیاه بادرنجبویه (*Mellisa officinalis* L.) با افزایش غلظت تیمار متانول ۵۰ درصد

روند افزایشی داشته است ولی در گیاه سرخارگل بیشترین میزان بیوسنتز کلروفیل تحت اعمال تیمار متانول ۳۰ درصد بوده است و غلظت‌های بالای الکل باعث کاهش در بیوسنتز کلروفیل شده است (Khosravi *et al.*, 2012).

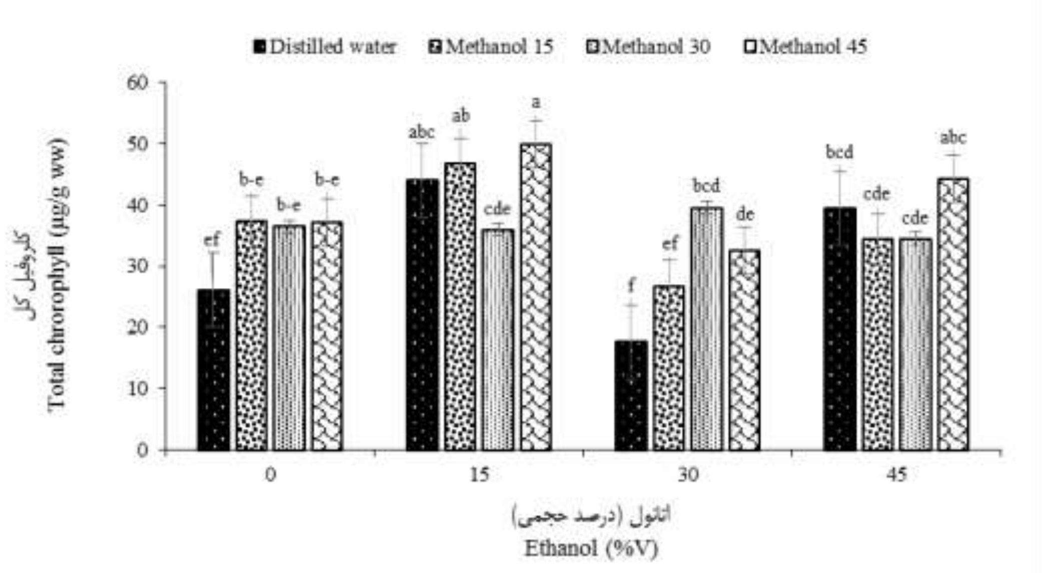


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل محلول‌پاشی اتانول و متانول بر میزان کلروفیل b در گیاه نعناع فلفلی

(میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با هم اختلاف معنی‌داری ندارند)

Figure 3- Comparison of the mean of interaction of ethanol and methanol foliar application on chlorophyll b in peppermint (LSD, p≤0.05)

(In each column, the means with similar letters are not significantly different)



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل محلول‌پاشی اتانول و متانول بر میزان کلروفیل کل در گیاه نعناع فلفلی

(میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با هم اختلاف معنی‌داری ندارند)

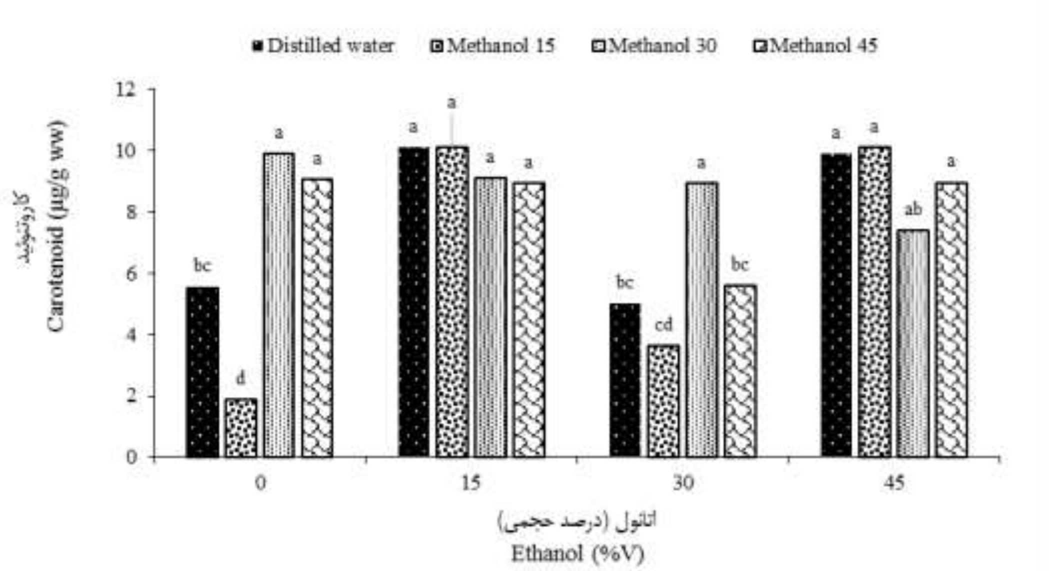
Figure 4- Comparison of the mean of interaction of ethanol and methanol foliar application on total chlorophyll in peppermint (LSD, p≤0.05)

(In each column, the means with similar letters are not significantly different)

تیمار برگ گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) با متانول سبب افزایش محتوای کلروفیل برگ شد (Ramirez *et al.*, 2006). همچنین بیشترین محتوای کلروفیل در برگ‌های گیاه مرزه (*Satureja hortensis*) نیز در اثر کاربرد اتانول ۴۰ درصد به‌دست

آمد (Nourafkan and Pouyanfar, 2017).

کاروتنوئید: نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر ساده و متقابل اتانول و متانول بر کارتنوئید برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثر متقابل اتانول و متانول بر کارتنوئید برگ نشان داد که بیشترین کارتنوئید مربوط به کاربرد اتانول ۱۵ درصد در تمام سطوح تیماری متانول، کاربرد متانول ۳۰ و ۴۵ درصد به همراه آب مقطر و کاربرد اتانول ۴۵ درصد به همراه آب مقطر، ۱۵ و ۴۵ درصد متانول بود. کمترین میانگین این صفت نیز در تیمار آب مقطر و متانول ۱۵ درصد حجمی (۱/۸۶ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل محلول‌پاشی اتانول و متانول بر میزان کاروتنوئید در گیاه نعناع فلفلی

(میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با هم اختلاف معنی‌داری ندارند)

Figure 5- Comparison of the mean of interaction of ethanol and methanol foliar application on carotenoid in peppermint (LSD, p≤0.05)

(In each column, the means with similar letters are not significantly different)

کاروتنوئیدها دسته‌ای از رنگدانه‌ها هستند که در جذب نور در گیاهان نقش مهمی دارند و می‌توانند اعمال فیزیولوژیکی متفاوتی را در گیاه انجام دهند. کاروتنوئیدها ترکیبات ضروری در تشکیلات فتوسنتزی می‌باشند و نقش اساسی آن‌ها حفاظت گیاه در برابر آسیب‌های فتواکسیداتیو می‌باشد. از دیگر وظایف کارتنوئیدها در گیاهان جذب نور در مرکز برداشت نور (LHC) فتوسیستم‌ها است (Bartley and Scolnik, 1995). برخی نتایج نشان داده است که کاربرد غلظت‌های بالای متانول روی غلظت کلروفیل اثر بازدارنده دارد و باعث کارایی فتوسیستم ۲ در کلروپلاست برگ‌های گیاه شود (Ramadan and Omran, 2005). این امر می‌تواند از دلایل اختلال در فعالیت دستگاه فتوسنتز و افزایش غلظت کارتنوئیدها باشد. یزدی‌فر و همکاران (Yazdifar *et al.*, 2015) گزارش کردند که محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف متانول (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد) منجر افزایش میزان کارتنوئید در گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) گردید.

فلاونوئید: بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر ساده اتانول و متانول بر فلاونوئید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین جدول مقایسه میانگین (جدول ۲) اثر اتانول و متانول بر فلاونوئید نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید مربوط به اتانول با غلظت ۱۵ درصد و متانول با غلظت ۴۵ درصد (۱۸/۴۲ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر برگ) و کمترین آن مربوط به تیمار آب مقطر (۱۲/۴۴ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر برگ) بود. محققان گزارش کردند که محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف متانول (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد) منجر افزایش میزان فلاونوئید در گیاه همیشه بهار گردید که با نتایج این پژوهش همخوانی داشت (Yazdifar *et al.*, 2015).

درصد و عملکرد اسانس: نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر ساده اتانول بر درصد اسانس و عملکرد اسانس به ترتیب در سطح احتمال یک و پنج درصد معنی‌دار بود اما اثر ساده متانول بر درصد و عملکرد اسانس اثر معنی‌داری نداشت. بیشترین درصد اسانس مربوط به تیمار اتانول با غلظت ۴۵ درصد حجمی (۱/۷۶ درصد) و کمترین آن مربوط به اتانول با غلظت

۱۵ درصد حجمی (۱/۳۲ درصد) بود که البته از لحاظ آماری با تیمارهای آب مقطر و ۳۰ درصد حجمی اتانول اختلاف معنی‌داری نداشت. در این پژوهش متانول هیچ گونه اثر معنی‌داری بر درصد اسانس گیاه نعناع فلفلی نداشته است. همچنین بیشترین عملکرد اسانس مربوط به تیمار اتانول با غلظت ۴۵ درصد حجمی (۴۹/۴۷ میلی‌گرم در بوته) و کم‌ترین آن مربوط به تیمار آب مقطر (۳۹/۰۶ میلی‌گرم در بوته) بود (جدول ۲).

در پژوهشی که به منظور بررسی اثر محلول‌پاشی متانول بر کیفیت و عملکرد گیاه ترخون انجام شد، مشخص گردید که محلول‌پاشی این ترکیب بر مقدار اسانس اثر معنی‌داری داشت و بیشترین میانگین این صفات در کاربرد متانول ۴۰ درصد مشاهده شد (Moradi and Ebadati Esfahani, 2016). یزدی‌فر و همکاران (Yazdifar *et al.*, 2015) گزارش کردند که محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف متانول (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد) منجر افزایش میزان اسانس در گیاه همیشه بهار گردید. همچنین در تحقیقی دیگر بیان شد که استفاده از محلول‌پاشی اتانول و متانول سبب افزایش میزان اسانس، تیمول و کارواکرول در گیاه آویشن باغی شد (Sajedi *et al.*, 2012). به‌طورکلی مواد مؤثره اگر چه اساساً با هدایت فرآیندهای ژنتیکی ساخته می‌شوند، اما سنتز آن‌ها به طور بارزی تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند، به‌طوری‌که عوامل محیطی سبب تغییراتی در رشد و نمو گیاهان دارویی و نیز کمیت و کیفیت مواد مؤثره آن‌ها می‌گردد (Omidbaigi, 2005). یکی از این عوامل استفاده از ترکیبات کربنی نظیر الکل‌های اتانول و متانول است که به دلیل داشتن مولکول‌های کوچکتر از دی‌اکسیدکربن به راحتی از طریق انتشار ساده و بدون صرف انرژی از غشای سلول گیاهی عبور کرده و جذب سلول‌های گیاهی می‌شوند (Asgari and Moeinfard, 2014).

درصد پروتئین: نتایج نشان داد که اثر ساده اتانول و متانول بر درصد پروتئین به ترتیب در سطح احتمال یک و پنج درصد معنی‌دار بود اما اثر متقابل این تیمار بر درصد پروتئین تأثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۱). بیشترین درصد پروتئین مربوط به تیمار محلول‌پاشی اتانول با غلظت ۴۵ درصد حجمی (۱۰/۷۰ درصد) بود که از لحاظ آماری با تیمارهای اتانول ۳۰ درصد و متانول ۱۵ و ۳۰ درصد در یک سطح قرار داشت (جدول ۲).

متانول به صورت فرمالدهید و دی‌اکسیدکربن در گیاه اکسید شده و به صورت اسیدهای آمینه سرین و متیونین و کربوهیدرات‌ها در بافت‌های مختلف گیاهان سه کربنه سنتز می‌شود (Nonomura and Benson, 1992). افزایش سرعت رشد و ارتفاع محصول پس از محلول‌پاشی متانول به علت افزایش غلظت دی‌اکسیدکربن در برگ‌ها و استفاده از متانول به عنوان یک منبع مستقیم در سنتز اسیدآمینه سرین و کاهش هدررفت کربن از طریق تنفس نوری می‌باشد (Nadali *et al.*, 2010). همچنین پیله‌وری خمامی و همکاران (Pilehvari Khomami *et al.*, 2008) گزارش کردند که عملکرد غلاف، دانه و مقدار پروتئین دانه‌های بادام زمینی با محلول‌پاشی متانول ۲۰ درصد افزایش یافت که با مصرف بیشتر متانول، سرعت رشد گیاه نیز در اثر افزایش بازده فتوسنتزی زیاد شده و تخصیص مواد پرورده به غلاف‌های در حال رشد افزایش یافت. آنها دلیل این افزایش را فعالیت بیشتر باکتری متیلوتروف و افزایش تولید هورمون سیتوکینین دانستند زیرا این هورمون بر سنتز پروتئین در گیاهان تأثیر مثبت دارد.

نتیجه‌گیری

محلول‌پاشی برگی یکی از روش‌های تغذیه و تأمین عناصر غذایی در گیاهان است که به دلیل بالا بودن سرعت جذب می‌توان عناصر غذایی را در کوتاه‌ترین زمان در دسترس گیاهان قرار داد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بیشترین ارتفاع بوته و بالاترین عملکرد بیولوژیک در تیمار ۱۵ درصد حجمی اتانول به‌دست آمد. همچنین محلول‌پاشی ۱۵ درصد حجمی اتانول به همراه ۱۵ درصد حجمی متانول بیشترین تأثیر مثبت را بر تعداد برگ در بوته و کلروفیل a داشته است. همچنین بالاترین میزان کاروفیل b، کلروفیل کل و فلاونوئید کل از تیمار تلفیقی ۱۵ درصد حجمی اتانول به همراه ۴۵ درصد حجمی متانول حاصل شد. کاربرد اتانول ۴۵ درصد نیز سبب تولید بیشترین درصد و عملکرد اسانس و بالاترین درصد پروتئین در گیاه دارویی نعناع فلفلی شد. بنابراین استفاده از تیمارهای الکلی اتانول و متانول به‌صورت محلول‌پاشی نقش مهمی در افزایش عملکرد و کیفیت گیاه دارویی نعناع فلفلی داشت.

منابع

1- Abbasian A., Mirshekari B., Safarzade Vishekaei M.N., Rashidi V., and Aminpanah H. 2016. Effects of the foliar application of methanol on the yield and growth of rice (*Oryza sativa* cv. Shiroudi). Ciencia e Investigacion Agrarian 43(1): 17-24. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202016000100002.

2- Arnon A.N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal 23: 112-121.

3- Asgari A.A., and Moeinfard A. 2014. Effect of foliar spraying on plants as a new method in agriculture. 1st National Congress of Biology and Natural Sciences of Iran, Tehran, Iran. (In Persian)

4- Atmodjo M.A., Hao Z., and Mohnen D. 2013. Evolving views of pectin biosynthesis. Annual Review of Plant Biology 64: 747-779. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105534.
5- Bagheri A., Nezami A., Ganjali A., and Parsa, M. 1997. Peas Cultivation. University of Mashhad Publications. 444 pp. (In Persian)
6- Bartley E.G., and Scolnik P.A. 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction and human health. The Plant Cell 7: 1027-1038. https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1027.
7- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-54. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.
8- Chen L., Chan S., and Cossins E.A. 1997. Distribution of folate derivatives and enzymes for synthesis of 10 formyltetrahydrofolate in cytosolic and mitochondrial fractionsof pea leaves. Plant Physiology 115: 299-309. doi: 10.1104/pp.115.1.299.
9- Dai J., Orsat V., Raghavan G.S., and Yaylayan V. 2010. Investigation of various factors for the extraction of peppermint (*Mentha piperita* L.) leaves. Journal of Food Engineering 96: 540-3. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.037.
10- Deleris A., Halter T., and Navarro L. 2016. DNA methylation and demethylation in plant immunity. Annual Review Phytopathology 54: 579-603. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080615-100308.
11- Dorokhov Y.L., Sheshukova E.V., and Komarova T.V. 2018. Methanol in plant life. Frontiers in Plant Science 9, 1623. doi: 10.3389/fpls.2018.01623.
12- Dorokhov Y.L., Shindyapina A.V., Sheshukova E.V., and Komarova T.V. 2015. Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. Physiological Reviews 95: 603-644. DOI: 10.1152/physrev.00034.2014.
13- Ebrahimzadeh M.A., Hosseinimehr S.J., Hamidinia A., and Jafari M. 2010. Antioxidant and free radical scavenging activity of Feijoa sallowiana fruits peel and leaves. Pharmacology Online 1: 7-14.
14- Gout E., Aubert S., Bligny R., Rebeille F., Nonomura A.R., Benson A.A., and Douce R. 2000. Metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies. Plant Physiology 123: 287-296. doi: 10.1104/pp.123.1.287.
15- Hanson A.D., and Roje S. 2001. One carbon metabolism in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 119-138. DOI: 10.1146/annurev.arplant.52.1.119.
16- Ivanova E.G., Doronina N.V., and Trotsenko Y.A. 2001. Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. Microbiology 70: 392-397. DOI: 10.1023/A:1010469708107.
17- Jafari Marandi S., and Majd A. 2008. The effect of alcoholic treatments (ethanol and methanol) on the development of vegetative meristem, formation of flower components, change in the number of flowering shoots, development of embryos and possibility of delaying aging in clove flowers. Quarterly Journal of Developmental Biology 1: 9-14. (In Persian with English abstract)
18- Khosravi E., Mehrafarin A., Naghdibadi H., Haji Aghaee R., and Khosravi M.T. 2012. The phytochemical response of *Melissa officinalis* L. to foliar application of hydro-alcoholic solutions (methanol and ethanol). Journal of Herbal Drugs 3(1): 21-25. (In Persian with English abstract)
19- Kim S.J., and Brandizzi F. 2016. The plant secretory pathway for the trafficking of cell wall polysaccharides and glycoproteins. Glycobiology, 26: 940-949. DOI: 10.1093/glycob/cww044.
20- Komarova T.V., Pozdyshev D.V., Petrunia I.V., Sheshukova E.V., and Dorokhov Y.L. 2014. Pectin methylesterase-generated methanol may be involved in tobacco leaf growth. Biochemistry (Moscow) 79: 102-110. DOI: 10.1134/S0006297914020035.
21- Kumar A., Samarth R.M., and Yasmeen S. 2004. Anticancer and radioprotective potentials of *Mentha piperita* L. BioFactors 22: 87-91. DOI: 10.1002/biof.5520220117.
22- Makhdum I.M., Nawaz A., Shabab M., Ahmad F., and Illahi F. 2002. Physiological response of cotton to methanol foliar application. Journal of Research, (Science) Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan 13: 37-43.
23- Mehrafarin A., Naghdi Badi H., Poorhadi M., Hadavi E., Ghavami N., and Kadkhoda Z. 2011. Phytochemical and agronomic response of peppermint (*Mentha piperita* L.) to urea and biofertilizers application. Journal of Medicinal Plants 10(4): 107-118. (In Persian with English abstract)
24- Mehrafarin A., Naghdi Badi H., Qaderi A., Labbafi M.R., Zand E., Noormohammadi Gh., Qavami N., and Seif Sahandi M. 2015. Changes in seed yield and mucilage of Fenugreek (*Trigonella foenum*-graecum L.) in response to foliar application of methanol as a bio-stimulant. Journal of Medicinal Plants 2(54): 86-100. (In Persian with English abstract)
25- Moradi P., and Ebadati Esfahani R. 2016. Effect of foliar application methanol on the quality and quantity of *Artemisia dracunculus* L. Electronic Journal of Biology S1: 24-29.
26- Nadali I., Paknejad F., Moradi F., and Vazan S. 2010. Effect of methanol on yield and some quality characteristics of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cv. Rasoul in drought and non-drought stress conditions. Seed and Plant Production 26: 95-108. (In Persian with English abstract)
27- Nazari Moghadam R. 2014. Effect of foliar application of methanol and ethanol on essential oil content and

vegetative growth of *Anethum graveolens*. MSc Thesis, Islamic Azad University of Miyaneh Branch, East Azerbaijan, Iran. (In Persian with English abstract)

28- Nonomura A.M., and Benson A.A. 1992. The path of carbon in photosynthesis: Improved crop yield with methanol. Proceedings of the National Academy of Sciences 89: 9794-9798. doi: 10.1073/pnas.89.20.9794.

29- Nourafkan H., and Kalantari Z. 2017. The effect of methanol and ethanol foliar application on peppermint morpho-physiological characteristics. Agroecology Journal 12(4): 1-9. (In Persian with English abstract)

30- Nourafkan H., and Pouyanfar M. 2017. Savory Morpho-physiological traits affected by methanol and ethanol foliar application. Agroecology Journal 3(1): 9-17. (In Persian with English abstract)

31- Omidbaigi R. 2005. Production and Processing of Medicinal Plants. Volume II, Astane Ghodse Razavi Publications. 438 Pp. (In Persian)

32- Pilehvari Khomami R., Safarzadeh Vishkaei M.N., Sajedi N.A., Rasooli M., and Moradi M. 2008. The effect of methanol and zinc on quantitative and qualitative parameters of peanuts in Guilan. New Finding in Agriculture 2(4): 339-351. (In Persian with English abstract)

33- Rajala A., Karkkainen J., Peltonen J., and Peltonen-Sainio P. 1998. Folia applications of alcohols failed to enhance growth and yield of C3 crops. Industrial Crops and Products 7: 129-137. DOI : 10.1016/S0926-6690(97)00041-1.

34- Ramadan T., and Omran Y.A.M. 2005. The effect of foliar application of methanol on productivity and fruit quality of grapevine cv. Flame Seedless. Vitis 44(1): 11-16. DOI: https://doi.org/10.5073/vitis.2005.44.11-16.

35- Ramirez I., Dorta F., Espinoza V., Jimenez E., Mercado A., and Pena-Cortes H. 2006. Effects of foliar and root applications of methanol on the growth of Arabidopsis, tobacco, and tomato plants. Journal of Plant Growth Regulation 25: 30-44. DOI: 10.1007/s00344-005-0027-9.

36- Safarzadeh Vishkaee M.N. 2007. The effect of methanol on peanut growth and yield. PhD Thesis, Islamic Azad University of Science and Research of Tehran, 236 pp. (In Persian with English abstract)

37- Saffer A.M. 2018. Expanding roles for pectins in plant development. Journal of Integrative Plant Biology 60: 910-923. DOI: 10.1111/jipb.12662.

38- Sajedi Moghadam S., Mehrafarin A., Naghdi Badi H., Pazoki A.R., and Qavami N. 2012. Evaluation of phytochemical yield of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) under foliar application of hydroalcohols. Journal of Medicinal Plants 11(4): 130-140. (In Persian with English abstract)

39- Shah P.P., and Mello P.M.D. 2004. A review of medicinal uses and pharmacological effects of *Mentha piperita*. Natural Product Radiance 3: 4.214-221.

40- Tarhan S., Telci I., Tuncay M.T. and Polatci H. 2010. Product quality and energy consumption when drying peppermint by rotary drum dryer. Industrial Crops and Products 32: 420-427. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.003.

41- Theodoridou A., Dornemann D., and Kotzabasis K. 2002. Light dependent induction of strongly increased microalgal growth by methanol. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 2: 189-198. DOI: 10.1016/s0304-4165(02)00438-5.

42- Yazdifar S.H., Moradi P., and Yousefi Rad M. 2015. Effect of foliar application of methanol and chelated zinc on the quantities and qualities yield of marigold (*Calendula officinalis* L). Journal of Applied Environmental and Biological Sciences 4: 170-176.